



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C07K	A2	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/07728 (43) Date de publication internationale: 18 février 1999 (18.02.99)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/01757</p> <p>(22) Date de dépôt international: 6 août 1998 (06.08.98)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 97/10297 12 août 1997 (12.08.97) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): SYNT:EM (S.A.) [FR/FR]; Parc Scientifique, Georges Besse, F-30000 Nîmes (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): CALAS, Bernard [FR/FR]; 360, avenue du Père Prévost, F-34090 Montpellier (FR). GRASSY, Gérard [FR/FR]; 23, rue du Pradas, F-34470 Pérols (FR). CHAVANIEU, Alain [FR/FR]; 680, chemin des Bausquets, F-38820 Assas (FR). KACZOREK, Michel [FR/FR]; Synt:em, 145, allée Charles Babbage, F-30900 Nîmes (FR).</p> <p>(74) Mandataire: BREESE-MAJEROWICZ; 3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i></p>
<p>(54) Title: LINEAR PEPTIDES DERIVED FROM ANTIBIOTIC PEPTIDES, PREPARATION AND USE FOR VECTORING ACTIVE SUBSTANCES</p> <p>(54) Titre: PEPTIDES LINEAIRES DERIVES DE PEPTIDES ANTIBIOTIQUES, LEUR PREPARATION ET LEUR UTILISATION POUR VECTORISER DES SUBSTANCES ACTIVES</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns peptides derived from antibiotic peptides or analogues thereof, characterised in that they are devoid of sulphide bond. The invention also concerns the use of these linear peptides for vectoring chemical substances and chemical compounds formed by said peptides coupled with at least an active substance. The invention further concerns the preparation of said peptides and compositions containing them.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>La présente invention concerne des peptides dérivés de peptides antibiotiques ou d'analogues de ceux-ci, caractérisés en ce qu'ils sont dépourvus de pont disulfure. L'invention concerne également l'utilisation de ces peptides linéaires pour la vectorisation de substances chimiques ainsi que les composés chimiques formés de ces peptides couplés à au moins une substance active. L'invention concerne encore la préparation de ces peptides et de ces composés et les compositions les contenant.</p>		

BEST AVAILABLE COPY

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

PEPTIDES LINÉAIRES DÉRIVÉS DE PEPTIDES
ANTIBIOTIQUES, LEUR PRÉPARATION ET LEUR UTILISATION POUR
VECTORISER DES SUBSTANCES ACTIVES.

5

La présente invention concerne des peptides linéaires dérivés de peptides antibiotiques et leur utilisation pour vectoriser des substances actives. Plus particulièrement l'invention a pour objet de nouveaux composés formés d'un dérivé linéaire d'un peptide antibiotique lié à au moins une substance active, ainsi que la préparation de ces composés et les compositions les contenant.

A côté de leur système immunitaire responsable de mécanismes spécifiques de défense contre les agents infectieux, les vertébrés possèdent de nombreux peptides à activité antimicrobienne (Nicolas, P. et al., 1995, Annual Rev. Microbiol. 49, 277-304). Ces peptides sont seulement présents chez les invertébrés à courte durée de vie et à taux de renouvellement élevé, chez lesquels un système immunitaire à mémoire, long à s'établir et à développer une réponse appropriée, serait inadapté.

Les peptides antimicrobiens des vertébrés, quelque soit leur origine, vertébrés inférieurs ou supérieurs, tissus myéloïdes ou non myéloïdes, possèdent un certain nombre de propriétés communes :

- Une forte basicité due à la présence de nombreuses arginines et lysines.
- La capacité de former des structures amphipatiques. On entend par structure amphipatique des structures dans lesquelles les résidus hydrophobes sont spatialement séparés des résidus hydrophiles.
- Un très large spectre d'activité. Ils sont capables de détruire rapidement des bactéries (Gram+ et Gram-), des champignons, quelques protozoaires, des

virus à membrane et même certaines lignées de cellules cancéreuses.

Selon leur structure, les peptides antibiotiques peuvent être classés en trois grandes familles :

- Les peptides antibiotiques à hélices α amphipatiques : cécropines et maganines (Maloy, W. L. et al., 1995, BioPolymer 37, 105-122).

- Les peptides antibiotiques à feuillet β réunis par des ponts disulfures : défensines (Lehrer, R. I. et al., 1991, Cell 64:229-230 ; Lehrer, R. I. et al., 1993, Ann. Rev. Immunol. 11:105-128), protégrines (Kokryakov, V. N. et al., 1993, FEBS 337:231-236), tachyplésines (Nakamura, T. et al., 1988, J. Biol. Chem. 263:16709-16713 ; Miyata, T et al., 1989, J. Biochem. 106:663-668).

- les peptides antibiotiques à chaînes déstructurées contenant de nombreux coudes liés à la présence de multiples prolines : bacténécines et PR39 (Frank, R. W. et al., 1991, Eur. J. Biochem. 202, 849-854).

Malgré la diversité de leurs séquences, la plupart des peptides antibiotiques agissent par lyse directe de la membrane des cellules pathogènes. Leur nature basique facilite leur interaction avec les phospholipides chargés négativement, et leur caractère amphipatique leur permet ensuite de s'incorporer dans la membrane où ils s'agrègent pour former des pores par lesquels la cellule perd sa substance. Il est généralement admis que leur sélectivité préférentielle pour les cellules procaryotes, est due à la composition particulière de leurs membranes qui contiennent davantage de phospholipides anioniques que celles d'eucaryotes. De plus, les membranes plasmiques de cellules de mammifères contiennent toutes du cholestérol, dont le rôle est d'en moduler la fluidité

et qui pourrait gêner l'incorporation des peptides antibiotiques. Toutefois, la spécificité de ces derniers pour les microorganismes est faible si bien qu'ils présentent une forte cytotoxicité ce qui en limite l'utilisation.

La présence de peptides antibiotiques chez les vertébrés et plus particulièrement chez les mammifères soulève de nombreuses questions. Les immunologistes supposent que les composés à activité antimicrobienne non-spécifique que l'on rencontre au niveau des invertébrés constituent un moyen ancestral de défense qui a ensuite évolué pour conduire aux systèmes à mémoire beaucoup plus complexes. Quel est donc l'intérêt pour les mammifères, par exemple, d'avoir conservé certains peptides à activité antibiotique ? On admet que ces petites molécules toujours présentes dans les fluides biologiques, ou encore séquestrées dans certaines structures lymphocytaires, pourraient constituer une première ligne de défense en attendant que les anticorps spécifiques soient sécrétés (Nicolas, P. et al., 1995, Annual Rev. Microbiol. 49, 277-304). Ils pourraient également participer au sein des macrophages, à la destruction des membranes plasmiques des organismes pathogènes.

Quelque soit leur rôle exact, les peptides antibiotiques ont un intérêt considérable du fait de leur large spectre d'action et de la difficulté que les microorganismes ont à mettre en place des stratégies d'inactivation. De ce fait de très nombreuses recherches sont entreprises pour essayer de trouver de nouvelles molécules et d'obtenir des analogues plus performant que les peptides parents. Il se peut que dans l'avenir, ces peptides antibiotiques soient appelés à remplacer les antibiotiques issus de bactéries ou de champignons. Ainsi les demandes de brevet internationales PCT publiées sous les numéros WO95/03325, WO96/37508 et

WO97/02287 décrivent une nouvelle classe de peptides antibiotiques, désignés "protégrines", isolés de leucocytes de porcs ou encore préparés par synthèse chimique ou par génie génétique et présentant des activités antibactériennes, antivirales et antifongiques.

Actuellement, les peptides antibiotiques à feuillets β réunis par des ponts disulfures (défensines, protégrines, tachyplésines) sont particulièrement étudiés étant donné leur puissante activité antimicrobienne (bactéries, certains virus, champignons et parasites). Dans cette famille, les protégrines et les tachyplésines sont certainement les molécules les plus prometteuses étant donné la simplicité de leur structure et la facilité relative de leur synthèse.

On désigne sous le nom de protégrines un ensemble de cinq peptides désignés PG-1, PG-2, PG-3, PG-4 et PG-5 dont les séquences sont données ci-dessous, étroitement apparentés et isolés de leucocytes de porc (V.N. Kokryakov & col. FEBS lett. 327, 231-236) :

PG-1 : RGGRLCYCRRRFCVCVGR-NH₂

PG-2 : RGGRLCYCRRRFCICV...-NH₂

PG-3 : RGGGLCYCRRRFCVCVGR-NH₂

PG-4 : RGGRLCYCRGWICFCVGR-NH₂

PG-5 : RGGRLCYCRPRFCVCVGR-NH₂

Les tachyplésines (Tamura, H. et al., 1993, Chem. Pharm. Bul. Tokyo 41, 978-980), désignées T1, T2 et T3 et les polyphémusines (Muta, T., 1994, CIBA Found. Sym. 186, 160-174), désignées P1 et P2, dont les séquences sont données ci-dessous, sont des peptides homologues isolés de l'hémolymphe de deux crabes, *Tachypleus tridentatus* pour les tachyplésines T1, T2 et T3 et *Limulus polyphemus* pour les polyphémusines P1 et P2.

P1 : RRWCFRVCYRGFCYRKCR-NH₂

P2 : RRWCFRVCYKGFCYRKCR-NH₂

T1 : KWCFRVCYRGICYRRCR-NH₂

T2 : RWCFRVCYRGICYRKCR-NH₂

T3 : KWCFRVCYRGICYKRCR-NH₂

Protégrines, tachyplésines et polyphémusines
5 contiennent une forte proportion de résidus basiques
(lysines et arginines) et possèdent quatre cystéines qui
forment deux ponts disulfures parallèles. Ces trois
familles de peptides présentent également des homologues
avec certaines défensines et en particulier avec la
10 défensine humaine NP-1 (Kokryakov, V. N. et al., 1993,
Febs Let. 327, 231-236).

Tachyplésines et protégrines possèdent une
structure tridimensionnelle voisine. Il s'agit d'un
feuillet β antiparallèle stabilisé par les deux ponts
15 disulfures. Ces ponts jouent un rôle important dans
l'activité antibactérienne des protégrines et des
tachyplésines. Leur suppression, soit en protégeant les
groupements SH par des acétamidométhyles, soit en
remplaçant les cystéines par des alanines ou des
20 glycines, conduit à des analogues pratiquement dénués
d'activité *in vivo* (Lehrer, R. I. et al., 1996, Eur. J.
Biochem. 240:352-357).

Comme indiqué précédemment, les protégrines
et les tachyplésines ont une importante activité lytique
25 sur les cellules procaryotes. Les travaux de recherche
réalisés par la Demanderesse sur la cytotoxicité de ces
peptides sur des cellules de mammifère en culture, ont
permis de mettre en évidence, avant la mort des
cellules, des quantités non-négligeables de protégrines
30 et de tachyplésines dans le cytoplasme desdites
cellules. Il a été envisagé que la présence des peptides
dans le cytoplasme pouvait résulter d'un transport par
le biais de pores, mais ces pores ne sont perméables
qu'aux ions et aux petites molécules et leur diamètre
35 est trop petit pour permettre le passage des peptides
antibiotiques. Il semblerait que les protégrines et

tachyplésines, en plus de perforer la membrane plasmique, soient capables de la traverser.

Il est connu que la cytotoxicité et l'activité antimicrobienne des protégrines et des tachyplésines sont dus à leur capacité de s'agréger à l'intérieur de la membrane pour former des canaux multimériques (Mangoni, M. et al., 1996, Febs Let. 383, 93-98). La Demanderesse a alors envisagé que cette agrégation soit reliée à la structure tertiaire de ces peptides antibiotiques qui comportent plusieurs résidus cystéines, et des dérivés linéaires des protégrines et des tachyplésines dans lesquels les cystéines sont remplacées par divers acides aminés naturels, ont été synthétisés. Ces peptides ont été couplés, par leur extrémité N-terminale, à une molécule fluorescente ou à la biotine et la répartition de ces marqueurs à l'intérieur de la cellule a été observée par microscopie confocale.

Il a ainsi maintenant été trouvé que ces peptides sont non-toxiques et sans activité lytique mais sont par contre capables de traverser rapidement les membranes des cellules de mammifères par un mécanisme passif.

Ces dérivés linéaires des peptides antibiotiques constituent donc un nouveau système de vectorisation de substances actives qui est non toxique.

Par système de vectorisation, on entend selon l'invention, un processus capable de transporter ladite substance active jusqu'à une cible, comme par exemple :

- de faire traverser la membrane cellulaire à une substance active et de permettre la distribution de celle-ci dans le cytoplasme et/ou dans le compartiment nucléaire,

- d'amener une substance active au niveau d'un organe particulier, par exemple de faire franchir à cette substance active la barrière hémato-encéphalique,

- de forcer cette substance active à interagir spécifiquement avec un type cellulaire donné, comme par exemple les hématies.

La présente invention a donc pour objet des peptides dérivés des peptides antibiotiques ou d'analogues de ceux-ci, caractérisés en ce qu'ils sont dépourvus de pont disulfure.

On entend par analogue de peptides antibiotiques, un peptide dont la séquence en acides aminés a été modifiée sans que cela n'entraîne de modification dans les propriétés antibiotiques dudit peptide.

L'absence de pont disulfure dans les peptides de l'invention peut être obtenue par tout moyen connu de l'homme du métier, comme par exemple :

- en supprimant ou en remplaçant par d'autres acides aminés les résidus de cystéine de la séquence du peptide antibiotique,

- en bloquant les groupes -SH des résidus cystéines de façon à ce qu'ils ne forment pas de pont disulfure,

dès lors bien entendu que le peptide obtenu présente les propriétés de vectorisation sans toxicité pour les cellules décrites précédemment.

Ces modifications peuvent être réalisées lors de la préparation des peptides de l'invention, plus particulièrement par synthèse chimique ou par expression d'un gène codant pour ledit peptide, ou directement sur un peptide antibiotique par action d'agents chimiques permettant d'ouvrir et de bloquer les groupes -SH des résidus de cystéine.

Les modifications ci-dessus concernent
avantageusement tous les résidus de cystéines du peptide
antibiotique, mais dès lors que la présence d'un unique
résidu de cystéine ne permet pas la formation de pont
disulfure, les peptides de l'invention peuvent contenir
une seule cystéine. Les peptides antibiotiques naturels
présentent généralement 4 ou 6 résidus de cystéine
capables de former deux ou trois ponts disulfures, aussi
dans les peptides de l'invention, l'une seulement de ces
cystéines peut être maintenue et les trois ou cinq
autres sont modifiées ou bloquées.

Les peptides antibiotiques dont dérivent les
peptides de l'invention peuvent être des défensines, des
protégrines, des tachyplésines ou leurs analogues, dont
les propriétés antibiotiques leur sont conférées par
leur structure tertiaire résultant de la présence de
ponts disulfures.

Des peptides linéaire selon l'invention
répondent à l'une des formules suivantes :

BXXBXXXXBBBXXXXXXB (I)

BBXXBXXXXBXXXXBBXB (II)

qui peuvent être aussi représentées par la
formule unique (III) suivante :

B(XB)X(XB)X(XB)XX(XB)B(XB)XXX(XB)(XB)XB

dans lesquelles :

- les groupes B, identiques ou différents,
représentent un résidu d'acide aminé dont la chaîne
latérale porte un groupement basique, et

- les groupes X, identiques ou différents,
représentent un résidu d'acide aminé aliphatique ou
aromatique,

ou sont constitués d'une séquence d'au moins
5 et de préférence d'au moins 7 acides aminés successifs
de l'une des formules (I) ou (II), dès lors que cette

séquence présente les propriétés de vectorisation sans toxicité pour les cellules décrites précédemment.

5 B et X peuvent être des acides aminés naturels ou non, y compris des acides aminés de configuration D.

On peut citer comme exemple, les significations de B et X suivantes :

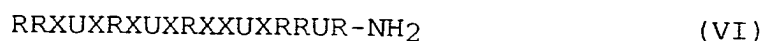
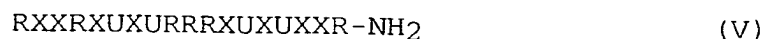
10 - B est choisi parmi l'arginine, la lysine, l'acide diaminoacétique, l'acide diaminobutyrique, l'acide diaminopropionique, l'ornithine.

15 - X est choisi parmi la glycine, l'alanine, la valine, la norleucine, l'isoleucine, la leucine, la cystéine, la cystéine^{Ac^m}, la penicillamine, la méthionine, la serine, la thréonine, l'asparagine, la glutamine, la phénylalanine, l'histidine, le tryptophane, la tyrosine, la proline, l'Abu, l'acide amino-1-cyclohexane carboxylique, l'Aib, la 2-aminotétraline carboxylique, la 4-bromophénylalanine, tert-Leucine, la 4-chlorophénylalanine, la β -cyclohexylalanine, la 3,4-dichlorophénylalanine, la 4-fluorophénylalanine, l'homoleucine, la β -homoleucine, l'homophénylalanine, la 4-méthylphénylalanine, la 1-naphtylalanine, la 2-naphtylalanine, la 4-nitrophénylalanine, la 3-nitrotyrosine, la norvaline, la phénylglycine, la 3-pyridylalanine, la [2-thiényl]alanine.

30 L'invention concerne aussi des dérivés des peptides de formules (I) ou (II) comme lesdits peptides sous forme rétro, ou des fragments des peptides de formules (I) ou (II) constitués de cinq et de préférence sept acides aminés successifs de l'une des formules (I) ou (II).

35

Parmi les peptides de l'invention, on peut citer plus particulièrement ceux répondant aux formules suivantes :



dans lesquelles

- U représente la sérine ou la thréonine,

- R représente l'arginine, et

- les groupes X identiques ou différents

représentent un acide aminés naturel ou non (y compris acides aminés de configuration D) aliphatiques ou aromatiques, comme la glycine, l'alanine, la valine, la norleucine, l'isoleucine, la leucine, la cystéine, la cystéine^{AcM}, la penicillamine, la méthionine, la serine, la thréonine, l'asparagine, la glutamine, la phénylalanine, l'histidine, le tryptophane, la tyrosine, la proline, l'Abu, l'acide amino-1-cyclohexane carboxylique, l'Aib, la 2-aminotétraline carboxylique, la 4-bromophénylalanine, tert-Leucine, la 4-chlorophénylalanine, la β-cyclohexylalanine, la 3,4-dichlorophénylalanine, la 4-fluorophénylalanine, l'homoleucine, la β-homoleucine, l'homophénylalanine, la 4-méthylphénylalanine, la 1-naphtylalanine, la 2-naphtylalanine, la 4-nitrophénylalanine, la 3-nitrotyrosine, la norvaline, la phénylglycine, la 3-pyridylalanine, la [2-thiényl]alanine.

Parmi les peptides de formules (I) et (II) ou leurs dérivés, l'invention envisage à titre spécifique ceux dérivés de protégrines et de tachyplésines rapportés dans les tableaux I et II ci-dessous.

Tableau I : dérivés de protégrines

Code	séquence	Modification
SM1738	RGGRLSYSRRRFSVSVGR	Tête de série
SM1736	rggrlsysrrrfsvsvgr	Aa de forme D de SM1738
SM1727	RGVSVSFRRRSYSLRGGR	Forme rétro de SM1738
SM1739	EGGELSYSEEEFSVSVGE	Inversion de charge (R → E)
SM2187	RGGRLAYRLLRFAIRVGR	Augmentation du caractère amphipathique
SM2188	OGGOXXBOXXOBXXXOXG	Augmentation du caractère hydrophobe
SM2189	RAARLGYRXXRFGZRVGR	Augmentation du caractère amphipathique
SM2194	YRRRFSVSVR	Partie C terminale de SM2193
SM2195	RRLSYRRRF	Partie N terminale de SM2193
SM2193	RRLSYRRRFSVSVR	Diminution de la flexibilité (délétion G)
SM2196	RGGRLSYSRRRFSTSTGR	Inhibition dimérisation

Tableau II : dérivés de tachyplésines

Code	Séquence	Modification
SM1726	KWSFRVSYRGISYRRSR	Tête de série
SM2307	RWSFRVSYRGISYRRSR	Mutation K → R
SM2392	rwsfrvsyrgisyrrsr	Aa de forme d (de SM2307)
SM2309	kwsfrvsyrgisyrrsr	Aa de forme d (de SM1726)
SM2310	RSRRYSIGRYSVRFSWK	Forme rétro
SM2190	OBXBOXXBOGXOBXXOX	Augmentation du caractère hydrophobe
SM2191	KWAFRVAYRGIRYLLRL	Augmentation du caractère amphipathique
SM2192	KYAWRVAHRGIRWLLRX	Augmentation du caractère amphipathique

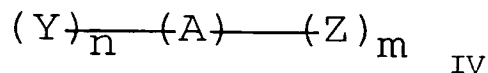
Dans les séquences des tableaux I et II ci-dessus, B représente la Napthylalanine, O représente l'Ornithine, X représente la Norleucine et Z représente la Norvaline.

L'invention concerne aussi l'utilisation des peptides ci-dessus pour la vectorisation d'une ou plusieurs substances actives tant pour des applications thérapeutiques que de diagnostic. A titre de substance active, l'invention envisage notamment des protéines ou fragments de protéines, comme des polypeptides ou

peptides, des anticorps ou partie d'anticorps, des acides nucléiques et oligonucléotides ou des ribozymes, ou encore, bien entendu des molécules chimiques actives pour le traitement ou la prévention de pathologies humaines ou animales, comme par exemple et de manière non limitative des antitumoraux, des antiviraux, des agents anti-inflammatoires, des agents empêchant la dégradation d'organes et/ou de tissus, etc...

Dans le domaine du diagnostic, la substance active peut être un marqueur radioactif, un marqueur coloré, ou tout autre moyen ou substance capable de révéler un métabolisme ou une pathologie.

L'invention a donc également pour objet des composés de formule (IV) suivante, ainsi que les compositions les contenant :



dans laquelle

- A représente un peptide linéaire dérivé d'un peptide antibiotique conforme à l'invention,

- Z représente une substance active, comme défini ci-dessus,

- Y représente un agent signal,

- n est 0 et ou plus, et avantageusement 0 ou 1,

- m est 1 ou plus, et de préférence jusqu'à 10 avantageusement jusqu'à 5.

Ainsi, les composés de formule (IV) ci-dessus sont formés à partir d'un peptide de l'invention couplé à une ou plusieurs substances actives, identiques ou différentes, représentées par le groupe (Z) dans la formule (IV), et éventuellement un ou plusieurs agents de signal, représentés par le groupe (Y) dans la formule (IV), ayant un rôle d'adressage du composé de formule (IV) vers un type cellulaire, un site ou compartiment de

la cellule ou un tissu particulier. Plus particulièrement, l'agent signal (Y) est un oligopeptide ou une protéine, comme un peptide signal, un signal de localisation nucléaire, un fragment d'anticorps, ou une

5 molécule chimique ligand ou anti-ligand d'un récepteur.

Dans une forme toute particulière de réalisation des composés de formule (IV), le groupe (Y) est fixé au groupe (Z).

Le couplage, symbolisé par les traits

10 horizontaux dans la formule (IV), peut être réalisé par tout moyen de liaison acceptable compte tenu de la nature chimique, de l'encombrement et du nombre de groupes (Z) et (Y) dans les composés de formule (IV), comme des liaisons covalentes, hydrophobes ou ioniques,

15 clivables ou non-clivables dans les milieux physiologiques. Le couplage peut être effectué en n'importe quel site du peptide (A), dans lequel des groupements fonctionnels tels que -OH, -SH, -COOH, -NH₂ sont naturellement présents ou ont été introduits.

L'invention envisage aussi la fixation de

20 plusieurs groupes (Z) sur un même site du peptide (A), soit directement, si ce site comporte plusieurs groupements fonctionnels, comme dans le cas d'une lysine C- ou N-terminale, soit indirectement via un groupe

25 intermédiaire portant plusieurs groupements réactionnels permettant d'y fixer plusieurs groupes (Z).

Les positions de couplage préférées pour la substance active sont au niveau des extrémités N-terminale ou C-terminale ou bien au niveau des

30 groupements amines primaires portés par les chaînes latérales des lysines du peptide (A). Dans le cas où l'on utilise l'extrémité C-terminale du peptide (A) pour accrocher la substance active (Z), l'extrémité N-terminale est disponible pour le couplage éventuel à un

35 agent signal (Y) permettant l'adressage du composé de

l'invention soit vers le noyau, soit encore vers un type tissulaire particulier.

En effet, par exemple dans le cas du couplage à l'extrémité C-terminale d'un peptide linéaire de l'invention, d'une substance active constituée par un marqueur fluorescent, ou de la biotine, ou encore d'une molécule médicamenteuse telle que la doxorubicine, le complexe covalent peptide-drogue après administration se répartit dans le cytoplasme de la cellule cible. Il est possible d'amener ce complexe dans le compartiment nucléaire en couplant à l'extrémité N-terminale du peptide une courte séquence basique, par exemple d'environ 7 acides aminés, correspondant à un signal de localisation nucléaire. Dans ces conditions, la biotine ou la doxorubicine se retrouvent dans le noyau de la cellule.

De la même manière, il est possible de vectoriser une drogue vers un type cellulaire donné, en ajoutant à l'extrémité N-terminale du peptide linéaire de l'invention couplé à son extrémité C-terminale à un médicament, une séquence peptidique capable de reconnaître spécifiquement un déterminant présent à la surface de type cellulaire. Ainsi, le pentadecapeptide α M2 (Swolapenko, G. B. et al., 1995, The Lancet 346, 1662-65) synthétique, fragment d'un anticorps monoclonal, dirigé contre un antigène exprimé par les cellules de cancer du sein (Tumour Associated Antigen Polymorphic Epithelial Mucin), conserve une bonne affinité pour ces cellules. Il est donc possible en associant α M2 à un ensemble peptide linéaire-médicament, d'amener cet ensemble préférentiellement vers les cellules qui expriment la caractéristique antigénique liée au cancer mammaire.

Les composés de formule (IV) peuvent être préparés par synthèse chimique ou en utilisant des techniques de biologie moléculaire.

On peut utiliser pour les synthèses chimiques des appareils commerciaux permettant d'incorporer des acides aminés non-naturels, tels que les énantiomères D et des résidus ayant des chaînes latérales ayant des hydrophobicités et des encombrements différents de ceux de leurs homologues naturels. Au cours de la synthèse, il est évidemment possible de réaliser un large éventail de modifications, par exemple introduire sur le N-terminal un lipide (prenyl ou myristyl) de façon à pouvoir ancrer le peptide de l'invention et donc le composé de formule (IV) à une membrane lipidique telle que celle d'un liposome constitué de lipides chargés positivement. Il est également possible de remplacer une ou plusieurs liaisons peptidiques (-CO-NH-) par des structures équivalentes comme -CO-N(CH₃)-, -CH₂-CH₂-, -CO-CH₂-, ou bien d'intercaler des groupes comme -CH₂-, -NH-, -O-.

On peut également obtenir les composés de formule (IV) ou partie de ceux-ci de nature protéique à partir d'une séquence d'acide nucléique codant pour celui-ci. La présente invention a aussi pour objet une molécule d'acide nucléique comprenant ou constituée par une séquence nucléique codant pour un peptide linéaire dérivé de peptide antibiotique. Plus particulièrement l'invention concerne une molécule d'acide nucléique comprenant au moins une séquence codant pour un composé de formule (IV) ou une partie de celui de nature protéique. Ces séquences d'acides nucléiques peuvent être des ADN ou ARN et être associées à des séquences de contrôle et/ou être insérées dans des vecteurs. Le vecteur utilisé est choisi en fonction de l'hôte dans lequel il sera transféré; il peut s'agir de tout vecteur comme un plasmide. Ces acides nucléiques et vecteurs sont utiles pour produire les peptides linéaires et les composés de formule (IV) ou partie de ceux-ci de nature protéique dans un hôte cellulaire. La préparation de ces

vecteurs ainsi que la production ou l'expression dans un hôte des peptides linéaires ou des composés de formule (IV) peuvent être réalisées par les techniques de biologie moléculaire et de génie génétique bien connues de l'homme du métier.

A titre d'exemple, un tel procédé de production d'un peptide selon l'invention consiste :

- à transférer une molécule d'acide nucléique ou un vecteur contenant ladite molécule dans un hôte cellulaire,

- à cultiver ledit hôte cellulaire dans des conditions permettant la production du peptide,

- à isoler, par tous moyens appropriés les peptides de l'invention.

L'hôte cellulaire mis en oeuvre dans ce type de procédé peut être choisi parmi les procaryotes ou les eucaryotes et notamment parmi les bactéries, les levures, les cellules de mammifères, de plantes ou d'insectes. L'invention concerne donc aussi les cellules transformées exprimant les peptides linéaires ou les composés de formule (IV) ou partie de ceux-ci de nature protéique.

L'invention se rapporte aussi :

- aux compositions pharmaceutiques comprenant comme principe actif au moins un composé de formule (IV) éventuellement associé à un véhicule ou support acceptable.

- aux agents de diagnostic constitués d'au moins un composé de formule (IV).

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans la description qui suit se rapportant à la préparation de composés de formule (IV) ainsi qu'aux travaux de recherche ayant mené à la mise en évidence des propriétés de vectorisation des peptides

linéaires de l'invention dérivés de peptides antibiotiques.

Exemple 1 : Fixation de la biotine et de la doxorubicine sur des analogues linéaires de peptides antibiotiques.

1) Préparation des peptides linéaires.

Les trois peptides de séquences ci-dessous ont été synthétisés :

RGGRLLXYXRRRFVXVGR-NH₂

RRWXFRVXYRGFXRYRKXR-NH₂

KWXFRVXYRGIXYRRXR-NH₂

dans lesquels X représente les résidus serine, thréonine ou alanine.

Ces peptides dérivent respectivement des séquences de la protéoglycane PG-1 de formule :

RGGRLLCYCRRRFVVCVGR-NH₂,

de la tachyplésine 1 de formule :

KWCFRVXYRGICYRRCR-NH₂,

de la polyphémusine de formule :

KWXFRVXYRGIXYRRXR-NH₂.

Ces trois peptides peuvent être préparés indifféremment soit à partir d'une chimie BOC, soit à partir d'une chimie FMOC, par des procédés classiques de synthèse en phase solide ou homogène.

2) Fixation de la biotine sur les peptides linéaires.

Le peptide est synthétisé en phase solide et après incorporation de l'arginine N-terminale on ajoute l'acide 5-aminopentanoïque. Le Fmoc ou le Boc N-terminal est enlevé et on fait réagir sur le peptide toujours accroché à la résine le N-hydroxy succinimide ester de la biotine dans le diméthylformamide. Après 15 heures de réaction à température ambiante, le peptide

5 biotinilé est coupé du support par action de l'acide trifluoroacétique ou de l'acide fluorohydrique selon des protocoles bien établis dans la chimie des peptides. Le peptide est ensuite purifié par chromatographie liquide à haute pression.

3) Fixation de la doxorubicine sur un peptide linéaire.

10 Pour fixer la doxorubicine, on synthétise en phase solide le peptide de formule :



15 Après clivage du support de purification, le peptide est traité par l'anhydre glutarique en présence de triéthylamine. Le peptide est alors purifié et le groupement -COOH porté par le glutaryl en N-terminal est activé par le mélange diisopropylcarbodiimide et 1-hydroxybenzotriazole. Après deux heures de réaction à température ambiante, de la doxorubicine est ajoutée et le mélange est agité pendant 12 heures à 0°C. L'ensemble peptide-doxorubicine est alors purifié par chromatographie liquide à haute pression.

20 Exemple 2 : Capacité des peptides linéaires de l'invention à passer les membranes de cellules.

25 1) Modèles cellulaires.

La capacité des peptides à passer les membranes a été testée sur divers types cellulaires (MCF7, MCF7R, HL60, HL60R, HeLa).

30 Les cellules sont cultivées sur RPMI 1640 (Gibco) auquel on ajoute 10% (v/v) de serum veau foetal, 2mM glutamine and 2mM penicilline/streptomycine, a 37°C. 30 000 cellules sontensemencées dans des chambres Lab Tek et cultivées pendant 1 jour.

2) Traitement par les peptides linéaires-biotine préparés conformément à l'exemple 1 (2).

Les cellules sont incubées dans de l'Opti-Mem (Gibco) pendant une heure avant d'être traitées pendant des temps variables avec les peptides marqués à la biotine.

Ces derniers sont obtenus conformément à l'exemple 1(2) en traitant 1 équivalent de peptide linéaire par 2 équivalents d'ester de N-hydroxysuccinimide de la biotine, puis purifié par chromatographie liquide à haute pression.

Les cellules sont ensuite fixées avec une solution à 3.7% de paraformaldéhyde pendant 5 minutes à 25°C, puis rincées trois fois avec du PBS. Elles sont ensuite perméabilisées par du Triton 0.1% (1 min, température ambiante). Après trois rinçages au PBS, les cellules sont incubées 10 min avec 200 µl d'anticorps TexRed dilué au 300^{ème} et rincées trois fois au PBS. Les lames sont enfin montées avec une solution Mowiol-Dabco et observées au photomicroscope Axiophot.

3) Traitement par les peptides linéaires-doxorubicine préparés conformément à l'exemple 1 (3).

Les cellules sont incubées pendant 15 minutes, puis rincées avec du PBS et ensuite la doxorubicine présente dans la cellule est dosée par chromatographie.

4) Résultats.

a) Parmi les peptides étudiés, ceux qui passent le plus facilement les membranes sont ceux répondant aux formules suivantes :

RXXRXUXURRRXUXXXR-NH₂ (V)

RRXUXRXUXRXXUXRRUR-NH₂ (VI)

dans lesquelles

- U représente la sérine ou la thréonine,

- R représente l'arginine, et

- les groupes X identiques ou différents
représentent un acide aminés naturel ou non (y compris
acides aminés de configuration D) aliphatiques ou
aromatiques, comme la glycine, l'alanine, la valine, la
norleucine, l'isoleucine, la leucine, la cystéine, la
cystéine^{Acm}, la penicillamine, la méthionine, la serine,
la thréonine, l'asparagine, la glutamine, la
phénylalanine, l'histidine, le tryptophane, la tyrosine,
la proline, l'Abu, l'acide amino-1-cyclohexane
carboxylique, l'Aib, la 2-aminotétraline carboxylique,
la 4-bromophénylalanine, tert-Leucine, la 4-
chlorophénylalanine, la β -cyclohexylalanine, la 3,4-
dichlorophénylalanine, la 4-fluorophénylalanine,
l'homoleucine, la β -homoleucine, l'homophénylalanine, la
4-méthylphénylalanine, la 1-naphtylalanine, la 2-
naphtylalanine, la 4-nitrophénylalanine, la 3-
nitrotyrosine, la norvaline, la phénylglycine, la 3-
pyridylalanine, la [2-thiényl]alanine.

b) Les résultats des expériences menées avec
la doxorucine montrent une augmentation significative de
la concentration plasmique et nucléaire en doxorubicine
lorsque celle-ci est couplée au peptide linéaire de
l'invention par rapport à l'utilisation de doxorubicine
seule.

c) Les expériences avec la biotine ont été
effectuées plus particulièrement sur des cellules MCF7
traitées à différents temps par un complexe biotine-
peptide de l'invention de formule :

biotine-RGGRLSYSRRRFSVSVGR-NH₂

Ces travaux ont donné lieu à des clichés
(non représentés) :

- Contrôle dans lequel la cellule a été
traitée avec la biotine seule.

- Traitement de la cellule pendant 2 minutes avec un complexe biotine-peptide linéaire de l'invention.

- Traitement de la cellule pendant 30 minutes avec un complexe biotine-peptide linéaire de l'invention.

On observe dans ces clichés que la biotine seule ne rentre pas dans la cellule et s'accumule faiblement autour de celle-ci. A l'inverse, avec le complexe de l'invention, on constate que la biotine est entraînée rapidement par le peptide linéaire de l'invention à l'intérieur de la cellule où elle est présente dans le cytoplasme et dans le noyau de la cellule.

Exemple 3 : Capacité d'internalisation des peptides linéaires de l'invention.

Des peptides linéaires de l'invention dérivés de Protégrines et Tachyplésines ont été testés sur différentes lignées cellulaires, dans le but d'évaluer leur internalisation respective.

1) Conditions Expérimentales.

Les cellules sontensemencées à environ 10^4 cellules par puits, 24 h avant l'addition des peptides biotinylés. Elles sont alors à 60-80% de confluence le jour de l'expérience. Les peptides biotinylés sont incubés avec les cellules à la concentration de $10\mu\text{M}$, pendant 15 minutes, à 37°C dans une atmosphère à 95% d'humidité et 5% de CO_2 dans un milieu OptiMem,. Les cellules sont lavées trois fois avec du PBS à température ambiante puis sont fixées à la formaline (3,7% de formaldéhyde dans PBS, 10 min à température ambiante). Elles sont ensuite lavées avec du PBS et perméabilisées pendant 15 min avec du PBS-TritonX-100.

La révélation est faite avec de la streptavidine-Texas-Red pendant 15 min à l'abri de la lumière et les cellules sont ensuite montées entre lame et lamelle. Elles sont observées en microscopie à fluorescence, et comparées à un témoin positif (Ap43-58), bien décrit dans la littérature, et à un témoin négatif.

Les noyaux des cellules ont été colorés avec du Hoechst.

2) Lignées cellulaires.

Toutes les lignées testées sont d'origine humaine et ont été obtenues commercialement auprès de l'ATCC.

- Lignées non tumorales : MRC5 (fibroblaste de poumon), HuVeC (endothéliale, cordon ombilical).

- Lignées tumorales : HT29 (carcinome du colon), HepG2 (hépatoblastome), A172 (glioblastome), HMCB (mélanome).

Les cellules sont cultivées à 37°C dans une atmosphère à 95% d'humidité et 5% de CO₂. Le milieu de culture est celui recommandé par l'ATCC.

3) Peptides testés.

Les deux séries de peptides testées sont celles des tableaux I et II.

4) Résultats.

Les résultats d'internalisation sont montrés dans les tableaux III et IV ci-dessous. Les peptides pénètrent dans les cellules avec différents degrés d'internalisation. Certains (tels que SM1739 et SM2190) ne sont pas internalisés alors que d'autres (tels que SM2307, SM2187, etc...) pénètrent avec une bonne efficacité. Nous avons aussi observé que certains peptides pénètrent beaucoup plus dans un type cellulaire

que dans d'autres. Par exemple, le SM2196 a une meilleure internalisation dans les cellules tumorales (HepG2, A172, et HT29) que dans les cellules non tumorales (MRC5 et HuVeC). A l'inverse, le peptide SM1738 pénètre beaucoup plus dans les lignées non tumorales que dans les lignées tumorales. Ces résultats suggèrent qu'il y aurait un tropisme cellulaire.

De manière générale, il apparaît que la forme rétro des têtes de série ne modifie pas de façon significative l'internalisation. L'augmentation de l'hydrophobie a un effet négatif, pour les deux familles de peptides testées. Il convient donc éviter d'augmenter l'hydrophobie. En revanche, une augmentation de l'amphipathie semble avoir un effet positif, au moins pour la famille Protégrine.

Tableau III : dérivés de protégrines

	HepG2	A172	HMCB	HuVeC	MRC5	HT29	Internalisation
SM1738	+	+	+	+++	+++	+	référence
SM1727	0	++	++	+++	+	+	pas d'effet significatif
SM1736	++	+	+++	++++	++++	+	pas d'effet significatif
SM1739	0	+	+	0	0	0	effet négatif
SM2187	+++	+++	++++	+++	++++	+++	effet positif
SM2189	+++	++	+++	++	++++	++	effet positif
SM2188	0	0	0	++	0	0	effet négatif
SM2193	++	++	+++	++	0	0	effet négatif
SM2194	0	+	+++	+	+	0	effet négatif
SM2195	++++	0	+++	+	+	++++	contradictoire
SM2196	++++	++++	++	+	+	++++	tropisme

Les photos de microscopie à fluorescence de l'internalisation sont présentées aux figures 1 et 2. Dans les lignées A172 et HT29, le peptide SM 1738, présenté à titre d'exemple, apparaît localisé majoritairement dans le cytoplasme et dans une zone périnucléaire. Dans le cas de la lignée HuVec, le peptide a une localisation majoritairement

cytoplasmique. La colonne de gauche correspond à la coloration du noyau par Hoechst.

Tableau II : dérivés de tachyplésines

	HepG2	A172	HMCB	HuVeC	MRC5	HT29	Internalisation
SM1726	+++	+	+++++	+++	+++	+++	référence
SM2310	nd	++	++++	+++	++	+++	pas d'effet
SM2309	nd	++++	++	++	++++	++++	nd
SM2191	++	++	++	nd	+++	+++	pas d'effet
SM2192	+	+++	++++	+++	++++	++	pas d'effet
SM2190	0	0	0	0	0	0	effet négatif
SM2307	nd	+++++	+++++	++++	++++	+++++	effet positif
SM2392	nd	+++	++++	++	+++	++++	pas d'effet

nd : non déterminé

Les photos de l'internalisation sont présentées aux figures 3 et 4 en annexe. Pour les 3 lignées cellulaires présentées (A172, HT29, HuVeC), le peptide biotinylé est localisé dans le cytoplasme de façon diffuse et marque également de façon nette le nucléole. La colonne de gauche correspond à la coloration du noyau par Hoechst.

Exemple 4 : Internalisation de la doxorubicine vectorisée.

Les cellules sontensemencées à environ 10^4 cellules par puits, 24 h avant l'addition des produits. Elles sont alors à 60-80% de confluence le jour de l'expérience. La doxorubicine libre d'une part, ou la doxorubicine couplée au vecteur SM1738 d'autre part, sont incubés avec les cellules MCF7 à la concentration de 10 μ M, pendant 60 minutes, à 37°C dans une atmosphère à 95% d'humidité et 5% de CO₂ dans le milieu de culture. La localisation subcellulaire de la doxorubicine, naturellement fluorescente, a été déterminée par microscopie confocale. Les résultats sont présentés à la figure 5 en annexe. La localisation est pour partie

cytoplasmique et pour partie nucléaire. Le noyau est alors marqué de façon diffuse.

Dans les séquences peptidiques rapportées
5 ci-dessus, les acides aminés sont représentés par leur code à une lettre, mais ils peuvent être aussi représentés par leur code à trois lettres selon la nomenclature ci-dessous.

	A	Ala	alanine
10	C	Cys	cystéine
	D	Asp	acide aspartique
	E	Glu	acide glutamique
	F	Phe	phénylalanine
	G	Gly	glycine
15	H	His	histidine
	I	Ile	isoleucine
	K	Lys	lysine
	L	Leu	leucine
	M	Met	méthionine
20	N	Asn	asparagine
	P	Pro	proline
	Q	Gln	glutamine
	R	Arg	arginine
	S	Ser	sérine
25	T	Thr	thréonine
	V	Val	valine
	W	Trp	tryptophane
	Y	Tyr	tyrosine

REVENDEICATIONS

5 1) Peptide dérivé d'un peptide antibiotique ou d'un analogue de celui-ci, caractérisé en ce qu'il est dépourvu de pont disulfure.

10 2) Peptide dérivé d'un peptide antibiotique ou d'un analogue de celui-ci, caractérisé en ce que tous les résidus cystéines, éventuellement sauf un, sont supprimés, remplacés par un autre résidu d'acide aminé ou bloqués au niveau de leur groupe SH.

15 3) Peptide linéaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 2, caractérisé en ce qu'il répond à l'une des formules suivantes :

BXXBXXXXBBBXXXXXXB (I)

BBXXXBXXXBXXXBBXB (II)

dans lesquelles :

20 - les groupes B, identiques ou différents, représentent un résidu d'acide aminé dont la chaîne latérale porte un groupement basique, et

- les groupes X, identiques ou différents, représentent un résidu d'acide aminé aliphatique ou aromatique,

25 ou en ce qu'il est constitué d'une succession d'au moins 5, et de préférence d'au moins 7 acides aminés successifs de l'une des formules (I) ou (II).

30 4) Peptide linéaire selon la revendication 3, caractérisé en ce que les groupes B sont choisis parmi l'arginine, la lysine, l'acide diaminoacétique, l'acide diaminobutyrique, l'acide diaminopropionique, l'ornithine.

35

5) Peptide linéaire selon l'une des revendications 3 à 4, caractérisé en ce que les groupes X sont choisis parmi la glycine, l'alanine, la valine, la norleucine, l'isoleucine, la leucine, la cystéine, la cystéine^{Acm}, la penicillamine, la méthionine, la serine, la thréonine, l'asparagine, la glutamine, la phénylalanine, l'histidine, le tryptophane, la tyrosine, la proline, l'Abu, l'acide amino-1-cyclohexane carboxylique, l'Aib, la 2-aminotétraline carboxylique, la 4-bromophénylalanine, tert-Leucine, la 4-chlorophénylalanine, la β -cyclohexylalanine, la 3,4-dichlorophénylalanine, la 4-fluorophénylalanine, l'homoleucine, la β -homoleucine, l'homophénylalanine, la 4-méthylphénylalanine, la 1-naphtylalanine, la 2-naphtylalanine, la 4-nitrophénylalanine, la 3-nitrotyrosine, la norvaline, la phénylglycine, la 3-pyridylalanine, la [2-thiényl]alanine.

6) Peptide linéaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il répond à l'une des formules suivantes :



dans lesquelles

- U représente la sérine ou la thréonine,
- R représente l'arginine, et
- les groupes X identiques ou différents représentent un acide aminés naturel ou non, y compris acides aminés de configuration D, aliphatiques ou aromatiques, comme la glycine, l'alanine, la valine, la norleucine, l'isoleucine, la leucine, la cystéine, la cystéine^{Acm}, la penicillamine, la méthionine, la serine, la thréonine, l'asparagine, la glutamine, la phénylalanine, l'histidine, le tryptophane, la tyrosine, la proline, l'Abu, l'acide amino-1-cyclohexane carboxylique, l'Aib, la 2-aminotétraline carboxylique,

la 4-bromophénylalanine, tert-Leucine, la 4-chlorophénylalanine, la β -cyclohexylalanine, la 3,4-dichlorophénylalanine, la 4-fluorophénylalanine, l'homoleucine, la β -homoleucine, l'homophénylalanine, la
5 4-méthylphénylalanine, la 1-naphtylalanine, la 2-naphtylalanine, la 4-nitrophénylalanine, la 3-nitrotyrosine, la norvaline, la phénylglycine, la 3-pyridylalanine, la [2-thiényl]alanine.

10 7) Peptide linéaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, de séquences suivantes :

RGGRLSYSRRRFSVSVGR,

RGVSVSFRRRSYSLRGGR,

EGGELSYSEEEFSVSVGE,

15 RGGRLAYRLLRFAIRVGR,

OGGOXXBOXXOBXXXOXG,

RAARLGYRXXRFGZRVGR,

YRRRFSVSVR,

RRLSYSRRRF,

20 RRLSYSRRRFSVSVR,

RGGRLSYSRRRFSTSTGR,

où B représente la Napthylalanine, O représente l'Ornithine, X représente la Norleucine et Z représente la Norvaline.

25 8) Peptide linéaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, de séquences suivantes :

KWSFRVSYRGISYRRSR,

RWSFRVSYRGISYRRSR,

30 RSRYSIGRYSVRFSWK,

OBXBOXXBOGXOBXXOX,

KWAFRVAYRGIRYLLRL,

KYAWRVAHRGIRWLLRX

35 où B représente la Napthylalanine, O représente l'Ornithine, X représente la Norleucine et Z représente la Norvaline.

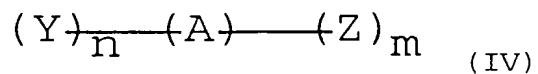
9) Utilisation d'un peptide antibiotique ou d'un analogue de celui-ci, dépourvu de pont disulfure, pour vectoriser des substances actives dans un organisme.

5

10) Utilisation d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, pour vectoriser des substances actives dans un organisme.

10

11) Composé de formule (IV) suivante :



dans laquelle

15

- A représente un peptide linéaire dérivé d'un peptide antibiotique ou d'un analogue de celui-ci,

- Z représente une substance active,

- Y représente un agent signal,

- n est 0 et ou plus, et avantageusement 0 ou 1,

20

- m est 1 ou plus, et de préférence jusqu'à 10, avantageusement jusqu'à 5.

25

12) Composé de formule (IV) dans laquelle A est définie comme dans l'une quelconque des revendications 1 à 8.

30

13) Composé selon l'une des revendications 11 ou 12, caractérisé en ce que le couplage entre le peptide linéaire (A) et le groupe (Z) ou les groupes (Z) et (Y) est réalisé par une ou plusieurs liaisons covalentes, hydrophobes ou ioniques.

35

14) Composé selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, caractérisé en ce que l'une au moins des substances actives (Z) est fixée par une liaison covalente soit aux extrémités N-terminale ou C-

terminale, soit au niveau des groupements amines primaires portés par les chaînes latérales des lysines, du peptide linéaire (A).

5 15) Composé selon l'une quelconque des revendications 11 à 14, caractérisé en ce qu'au moins un agent signal (Y), s'il est présent, est fixé par une liaison covalente à l'extrémité N-terminale du peptide linéaire (A).

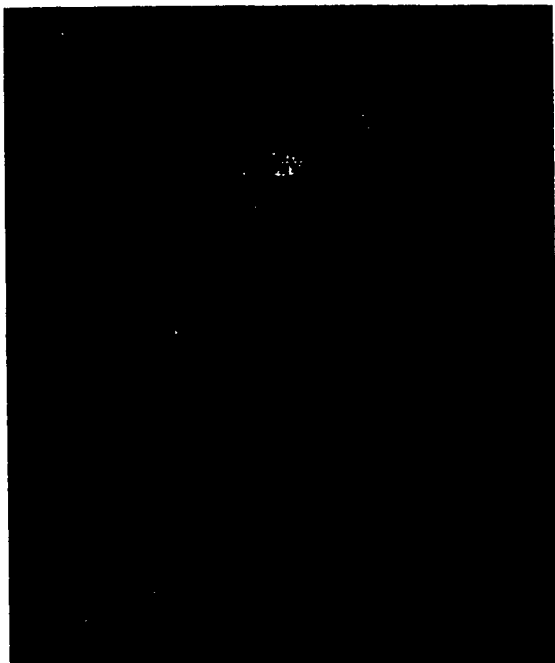
10 16) Composition pharmaceutique caractérisé en ce qu'elle comprend comme principe actif au moins un composé de formule (IV) selon l'une quelconque des revendications 11 à 15.

15 17) Un agent de diagnostic constitué d'au moins un composé de formule (IV) selon l'une quelconque des revendications 11 à 15.

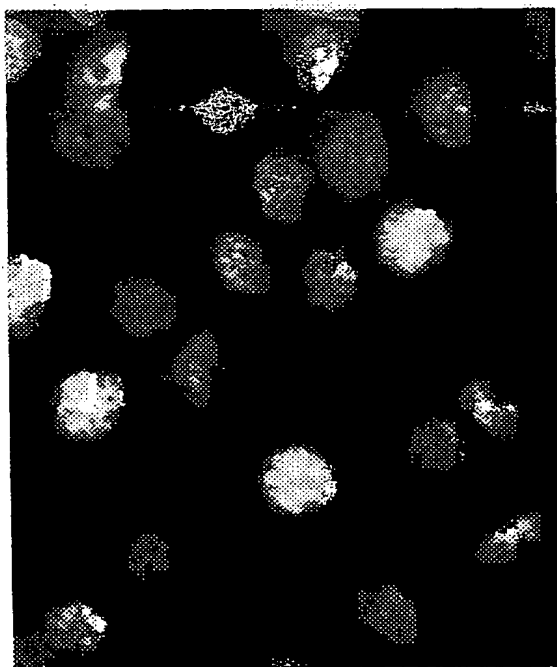
1/5

Figure 1

Texas Red



Hoechst



Peptide: SM1738
Lignée: A172

Peptide: SM1738
Lignée: HT29



2/5

Figure 2

Texas Red



Hoechst

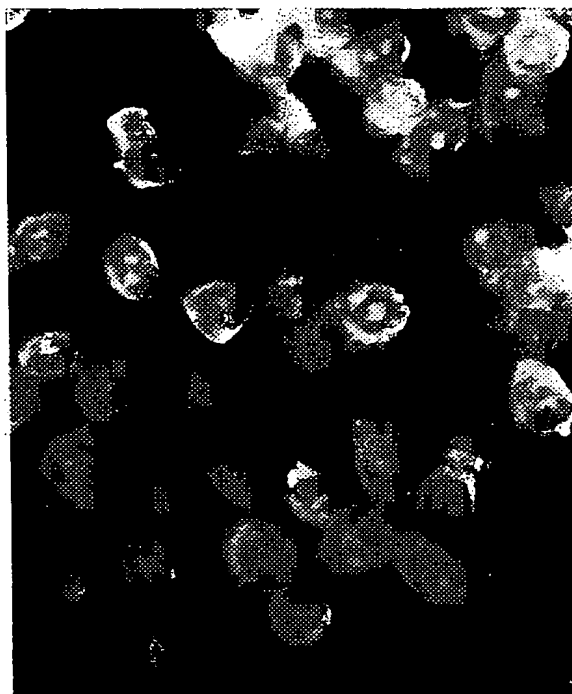
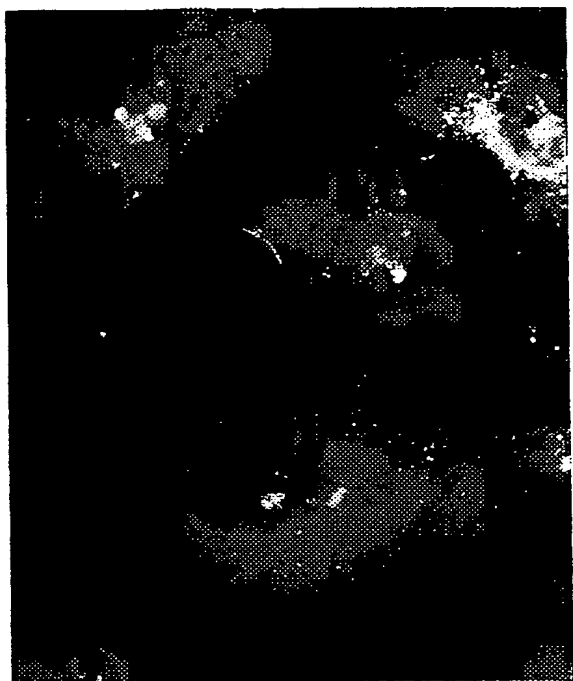


Peptide: SM1738
Lignée: HuVeC

3/5

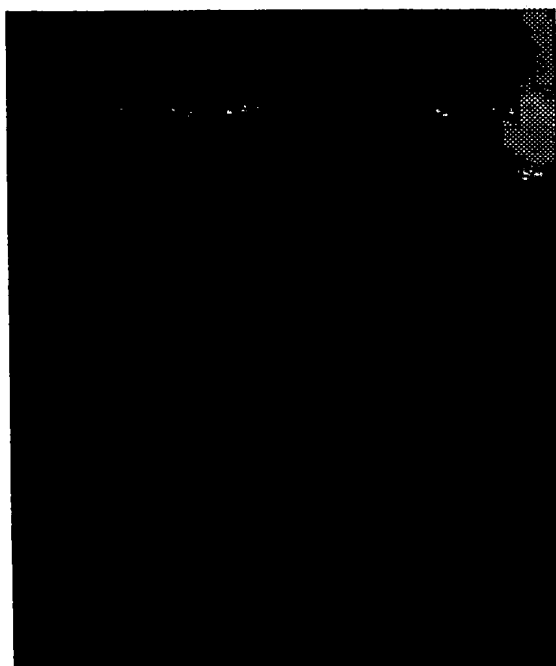
Figure 3

Texas Red



Hoechst

Peptide SM2307
Lignée: A172

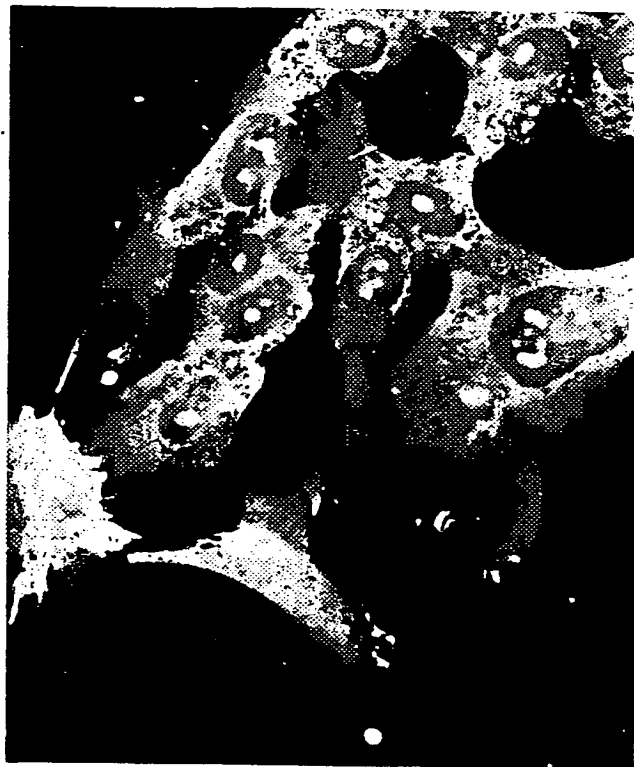


Peptide SM2307
Lignée: HT29



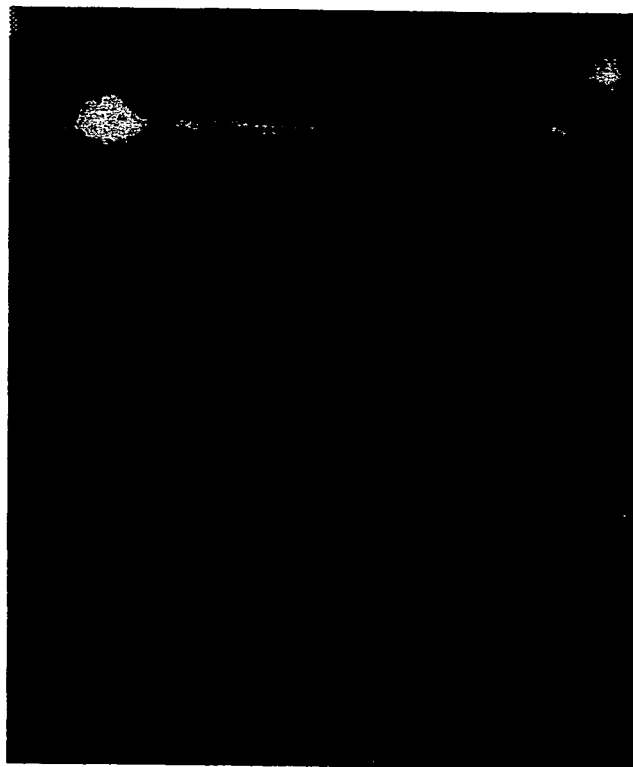
Figure 4

Texas Red



Hoechst

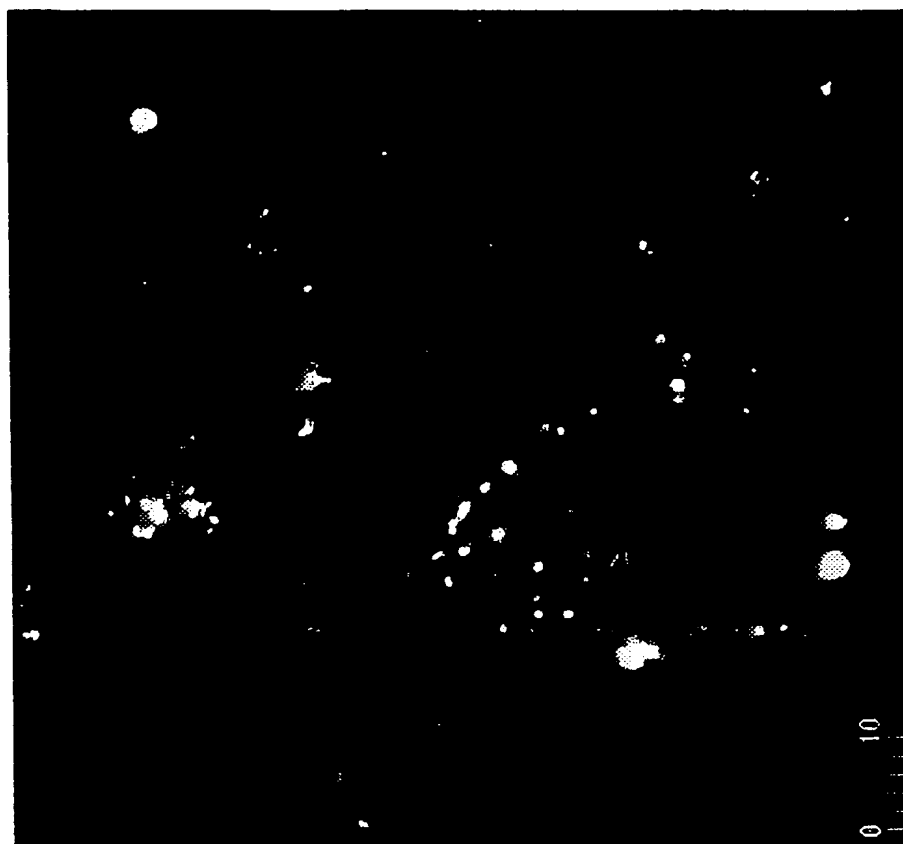
Peptide SM2307
Lignée:HuVeC



5/5

Figure 5

SM1738-dox
10 μ M, 60 min, MCF7



THIS PAGE BLANK (USPTO)



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C07K 7/08, A61K 38/10, G01N 33/68		A3	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/07728
			(43) Date de publication internationale: 18 février 1999 (18.02.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/01757 (22) Date de dépôt international: 6 août 1998 (06.08.98) (30) Données relatives à la priorité: 97/10297 12 août 1997 (12.08.97) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): SYNT:EM (S.A.) [FR/FR]; Parc Scientifique, Georges Besse, F-30000 Nîmes (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): CALAS, Bernard [FR/FR]; 360, avenue du Père Prévost, F-34090 Montpellier (FR). GRASSY, Gérard [FR/FR]; 23, rue du Pradas, F-34470 Pérols (FR). CHAVANIEU, Alain [FR/FR]; 680, chemin des Bausquets, F-38820 Assas (FR). KACZOREK, Michel [FR/FR]; Synt:em, 145, allée Charles Babbage, F-30900 Nîmes (FR). (74) Mandataire: BREESE-MAJEROWICZ; 3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i> (88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 24 juin 1999 (24.06.99)	
(54) Title: LINEAR PEPTIDES DERIVED FROM ANTIBIOTIC PEPTIDES, PREPARATION AND USE FOR VECTORING ACTIVE SUBSTANCES			
(54) Titre: PEPTIDES LINEAIRES DERIVES DE PEPTIDES ANTIBIOTIQUES, LEUR PREPARATION ET LEUR UTILISATION POUR VECTORISER DES SUBSTANCES ACTIVES			
(57) Abstract <p>The invention concerns peptides derived from antibiotic peptides or analogues thereof, characterised in that they are devoid of sulphide bond. The invention also concerns the use of these linear peptides for vectoring chemical substances and chemical compounds formed by said peptides coupled with at least an active substance. The invention further concerns the preparation of said peptides and compositions containing them.</p>			
(57) Abrégé <p>La présente invention concerne des peptides dérivés de peptides antibiotiques ou d'analogues de ceux-ci, caractérisés en ce qu'ils sont dépourvus de pont disulfure. L'invention concerne également l'utilisation de ces peptides linéaires pour la vectorisation de substances chimiques ainsi que les composés chimiques formés de ces peptides couplés à au moins une substance active. L'invention concerne encore la préparation de ces peptides et de ces composés et les compositions les contenant.</p>			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce		de Macédoine	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PL	Pologne		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	PT	Portugal		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SD	Soudan		
DK	Danemark	LR	Libéria	SE	Suède		
EE	Estonie			SG	Singapour		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 98/01757

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C07K7/08 A61K38/10 G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K A61K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>QU, XIAO-DAN ET AL: "Protegrin structure and activity against Neisseria gonorrhoeae" INFECT. IMMUN. (1997), 65(2), 636-639 CODEN: INFIBR; ISSN: 0019-9567, 1997, XP002065780 see page 638, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 1; table 1</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1-5, 16

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 May 1999

Date of mailing of the international search report

11/05/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fuhr, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 98/01757

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MASUDA, MASAO ET AL: "A novel anti-HIV synthetic peptide, T-22 ('Tyr5,12, Lys7!-polyphemusin II)" BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1992), 189(2), 845-50 CODEN: BBRC9;ISSN: 0006-291X,1992, XP002065781 See compound T10 in fig. 1 see page 848, last paragraph - page 849, paragraph 2; figure 1 ---	1,2,16
X	TAMAMURA, HIROKAZU ET AL: "Antimicrobial activity and conformation of tachyplesin I and its analogs" CHEM. PHARM. BULL. (1993), 41(5), 978-80 CODEN: CPBTAL;ISSN: 0009-2363,1993, XP002047195 see page 978, right-hand column, paragraph 2 - page 979, right-hand column, paragraph 1; figure 1 ---	1,2,16
X	WO 97 18826 A (INTRABIOTICS PHARMACEUTICALS I ;UNIV CALIFORNIA (US)) 29 May 1997 See compound PC-8 see claims; example 12; table 17 ---	1-5,16
A	WO 94 18323 A (XOMA CORP) 18 August 1994 see page 3, line 12 - page 4, line 26 ---	1-6,16
A	WO 90 04408 A (MAGAININ SCIENCES INC) 3 May 1990 see claims; examples ---	1-7,16
X	WO 96 37508 A (UNIV CALIFORNIA LOS ANGELES) 28 November 1996 see page 20, line 34 - page 22, line 41; claims 4,6,7,12 see page 28, line 27 - page 30, line 15 ---	1-5
X	WO 95 16776 A (PIONEER HI BRED INT) 22 June 1995 voir SeqID No. 5, page 29 see page 14, line 34 - page 16, line 21; claims; examples -----	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/01757

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9718826 A	29-05-1997	AU 1162997 A	11-06-1997
		AU 7739496 A	11-06-1997
		CA 2238429 A	29-05-1997
		CZ 9801591 A	14-10-1998
		CZ 9801592 A	16-12-1998
		EP 0862448 A	09-09-1998
		EP 0865292 A	23-09-1998
		NO 982310 A	22-07-1998
		NO 982311 A	22-07-1998
		PL 326924 A	09-11-1998
		WO 9718827 A	29-05-1997
WO 9418323 A	18-08-1994	US 5420019 A	30-05-1995
		AU 693089 B	25-06-1998
		AU 6170294 A	29-08-1994
		CN 1120352 A	10-04-1996
		EP 0689592 A	03-01-1996
		FI 953658 A	07-09-1995
		JP 8506586 T	16-07-1996
		NO 953033 A	02-10-1995
		NZ 262284 A	24-11-1997
		US 5674834 A	07-10-1997
		US 5827816 A	27-10-1998
		ZA 9400703 A	05-09-1994
WO 9004408 A	03-05-1990	AT 107170 T	15-07-1994
		AU 641129 B	16-09-1993
		AU 4502889 A	14-05-1990
		CA 2001150 A	21-04-1990
		CN 1043263 A	27-06-1990
		DE 68916261 D	21-07-1994
		DE 68916261 T	22-09-1994
		DK 71591 A	21-06-1991
		EP 0441832 A	21-08-1991
		IL 92061 A	25-01-1994
		JP 4502904 T	28-05-1992
		PT 92078 A	30-04-1990
		US 5217956 A	08-06-1993
		GR 1000913 B	16-03-1993
WO 9637508 A	28-11-1996	US 5804558 A	08-09-1998
		AU 5874996 A	11-12-1996
		CA 2222475 A	28-11-1996
		EP 0871654 A	21-10-1998
WO 9516776 A	22-06-1995	US 5580852 A	03-12-1996
		AU 2287095 A	03-07-1995
		CA 2179301 A	22-06-1995
		EP 0734441 A	02-10-1996

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Requête Internationale No

PCT/FR 98/01757

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 C07K7/08 A61K38/10 G01N33/68		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C07K A61K G01N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	OU, XIAO-DAN ET AL: "Protegrin structure and activity against Neisseria gonorrhoeae" INFECT. IMMUN. (1997), 65(2), 636-639 CODEN: INFIBR;ISSN: 0019-9567,1997, XP002065780 voir page 638, colonne de gauche, alinéa 2 - colonne de droite, alinéa 1; tableau 1 ---	1-5,16
X	MASUDA, MASAO ET AL: "A novel anti-HIV synthetic peptide, T-22 ('Tyr5,12, Lys7!-polyphemusin II)" BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1992), 189(2), 845-50 CODEN: BBRC99;ISSN: 0006-291X,1992, XP002065781 * voir composé T10 en fig. 1 * voir page 848, dernier alinéa - page 849, alinéa 2; figure 1 ---	1,2,16
-/--		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-weight: bold;">3 mai 1999</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-weight: bold;">11/05/1999</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Fuhr, C</div>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Recherche Internationale No

PCT/FR 98/01757

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	TAMAMURA, HIROKAZU ET AL: "Antimicrobial activity and conformation of tachyplesin I and its analogs" CHEM. PHARM. BULL. (1993), 41(5), 978-80 CODEN: CPBTAL; ISSN: 0009-2363, 1993, XP002047195 voir page 978, colonne de droite, alinéa 2 - page 979, colonne de droite, alinéa 1; figure 1 ---	1,2,16
X	WO 97 18826 A (INTRABIOTICS PHARMACEUTICALS I ; UNIV CALIFORNIA (US)) 29 mai 1997 * voir composé PC-8 * voir revendications; exemple 12; tableau 17 ---	1-5,16
A	WO 94 18323 A (XOMA CORP) 18 août 1994 voir page 3, ligne 12 - page 4, ligne 26 ---	1-6,16
A	WO 90 04408 A (MAGAININ SCIENCES INC) 3 mai 1990 voir revendications; exemples ---	1-7,16
X	WO 96 37508 A (UNIV CALIFORNIA LOS ANGELES) 28 novembre 1996 voir page 20, ligne 34 - page 22, ligne 41; revendications 4,6,7,12 voir page 28, ligne 27 - page 30, ligne 15 ---	1-5
X	WO 95 16776 A (PIONEER HI BRED INT) 22 juin 1995 voir SeqID No. 5, page 29 voir page 14, ligne 34 - page 16, ligne 21; revendications; exemples -----	1-5

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Requête Internationale No

PCT/FR 98/01757

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9718826 A	29-05-1997	AU 1162997 A	11-06-1997
		AU 7739496 A	11-06-1997
		CA 2238429 A	29-05-1997
		CZ 9801591 A	14-10-1998
		CZ 9801592 A	16-12-1998
		EP 0862448 A	09-09-1998
		EP 0865292 A	23-09-1998
		NO 982310 A	22-07-1998
		NO 982311 A	22-07-1998
		PL 326924 A	09-11-1998
		WO 9718827 A	29-05-1997
WO 9418323 A	18-08-1994	US 5420019 A	30-05-1995
		AU 693089 B	25-06-1998
		AU 6170294 A	29-08-1994
		CN 1120352 A	10-04-1996
		EP 0689592 A	03-01-1996
		FI 953658 A	07-09-1995
		JP 8506586 T	16-07-1996
		NO 953033 A	02-10-1995
		NZ 262284 A	24-11-1997
		US 5674834 A	07-10-1997
		US 5827816 A	27-10-1998
		ZA 9400703 A	05-09-1994
WO 9004408 A	03-05-1990	AT 107170 T	15-07-1994
		AU 641129 B	16-09-1993
		AU 4502889 A	14-05-1990
		CA 2001150 A	21-04-1990
		CN 1043263 A	27-06-1990
		DE 68916261 D	21-07-1994
		DE 68916261 T	22-09-1994
		DK 71591 A	21-06-1991
		EP 0441832 A	21-08-1991
		IL 92061 A	25-01-1994
		JP 4502904 T	28-05-1992
		PT 92078 A	30-04-1990
		US 5217956 A	08-06-1993
		GR 1000913 B	16-03-1993
WO 9637508 A	28-11-1996	US 5804558 A	08-09-1998
		AU 5874996 A	11-12-1996
		CA 2222475 A	28-11-1996
		EP 0871654 A	21-10-1998
WO 9516776 A	22-06-1995	US 5580852 A	03-12-1996
		AU 2287095 A	03-07-1995
		CA 2179301 A	22-06-1995
		EP 0734441 A	02-10-1996

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)